ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201711.01837v1

谷氨酰胺对过氧化氢诱导氧化应激人结肠癌 HT-29 细胞损伤和凋亡的影响

肖英平 [1,2]　桂国弘 [3]　陈安国 [4]　何祥祥 [1,2]　李开锋 [1,2]　杨　华 [1,2*]

（1.浙江省农业科学院农产品质量标准研究所，杭州 310021；2.浙江省植物有害生物防控省部共建国家重点实验室培育基地，杭州 310021；3.贵州大学动物科学学院，贵阳 550025；4.浙江大学动物科学学院，杭州 310058）

摘　要：本试验旨在通过研究谷氨酰胺对过氧化氢（H_2O_2）诱导氧化应激人结肠癌 HT-29 细胞损伤和凋亡的影响，阐明谷氨酰胺的抗氧化效果和作用机理。HT-29 细胞经 0（对照组）、0.5、2.0、10.0 mmol/L 谷氨酰胺和 0.35 mmol/L H_2O_2 分别处理 12、24、32 h 后，测定细胞的超氧化物歧化酶（SOD）活性和丙二醛（MDA）含量，并采用荧光定量 PCR 方法分析谷氨酰胺对 H_2O_2 诱导的细胞凋亡相关基因的 mRNA 相对表达量，以及采用 Annexin V-FITC/PI 双染法对 HT-29 细胞染色，并用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。结果表明：1)处理 24 h 后，0.5、2.0 mmol/L Gln 组 SOD 活性显著高于对照组（$P<0.05$）；处理 32 h 后，0.5、2.0 mmol/L Gln 组 SOD 活性显著高于对照组（$P<0.05$），MDA 含量显著低于对照组（$P<0.05$）。2）处理 12 h 后，各组天冬氨酸蛋白水解酶-3（*Caspase*-3）和 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白（*Bax*）mRNA 相对表达量无显著差异（$P>0.05$）。与对照组比较，0.5 mmol/L Gln 组核转录因子 κB（*NF-κB*）mRNA 相对表达量显著降低（$P<0.05$），0.5 与 2.0 mmol/L Gln 组 B 淋巴细胞瘤-2（*Bcl*-2）mRNA 相对表达量显著提高（$P<0.05$）。处理 24 h 后，与对照组比较，0.5、2.0 和 10.0 mmol/L Gln 组 *Caspase*-3、*NF-κB* 和 *Bax* mRNA 相对表达量均显著降低（$P<0.05$），*Bcl*-2 mRNA 相对表达量显著升高（$P<0.05$）。处理 32 h 后，与对照组比较，2.0 mmol/L Gln 组脂肪酸合成酶（*FAS*）、*Caspase*-3、*NF-κB*、*Bax* mRNA 相对表达量均显著降低（$P<0.05$），*Bcl*-2 mRNA 相对表达量显著升高（$P<0.05$）；10.0 mmol/L Gln 组 *FAS*、

收稿日期：2017-02-01

基金项目：国家自然科学基金（31402083）；浙江省自然科学基金重点项目（LZ15C170001）

作者简介：肖英平（1984—），男，江西兴国人，助理研究员，博士，研究方向为单胃动物营养。E-mail: ypxiaozju@126.com

*通信作者：杨　华，高级畜牧师，硕士生导师，E-mail: yanghua806@hotmail.com

Caspase-3、*NF-κB*、*Bax* mRNA 相对表达量均显著升高（$P<0.05$）。3）处理 24 h 后，与对照组比较，Gln 处理使活细胞数量提高了 5.32%~11.97%，坏死细胞数量降低了 6.75%~12.66%。处理 32 h 后，与对照组比较，Gln 处理使活细胞数量提高了 1.39%~7.63%，坏死细胞数量降低了 3.40%~4.57%。由此可见，谷氨酰胺可抑制氧化应激反应，降低 H_2O_2 诱导的 HT-29 细胞凋亡。

关键词：谷氨酰胺；氧化损伤；细胞凋亡；HT-29 细胞；过氧化氢

中图分类号：S811.3　　　　文献标识码：　　　　文章编号：

谷氨酰胺（glutamine，Gln）是一种条件性必需氨基酸，可促进蛋白质合成，在肠道上皮中作为生物活性物质，扮演信号分子的角色并调控信号通路，在保持肠道结构完整性和阻止肠腔有害微生物进行系统循环中起重要的调节作用[1]。Hubert-Buron 等[2]研究报道，Gln 可通过限制抑制因子 Bα（IκBα）水解降低肠道细胞的炎症反应。闫静等[3]研究表明，Gln 对化学性肝损伤的治疗作用不仅与其抗氧化、抗炎症反应有关，还可能通过改善肠道功能间接减轻肝损伤。郑善军等[4]用扫描电镜观察 Gln 对辐射损伤的大鼠肠面膜的保护作用，结果表明辐射组绒毛杂乱、窄小，排列无规律，绒毛顶端有明显溃烂，发生溃疡的绒毛数目较多；而补充 Gln 组动物肠黏膜绒毛宽大、钝圆，接近正常对照组的形态，排列整齐，绒毛顶端形成细小溃疡，但溃疡发生不普遍。

氧化应激是指由于机体内氧化与抗氧化作用失衡，导致产生对自身有负面作用的、具有氧化活性的中间产物，造成细胞损伤，引起机体衰老，甚至肿瘤等恶性疾病。活性氧簇作为细胞死亡途径的信号分子，通过线粒体释放促凋亡分子、激活天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyl aspartate specific proteinase，Caspase)级联反应，并参与凋亡过程的调节。目前发现的细胞凋亡途径主要包括 2 种：1）胞外信号激活胞内凋亡酶 Caspase 家族；2）线粒体释放凋亡酶激活因子，从而激活 Caspase 家族，活化的 Caspase 可将胞内重要蛋白降解，从而引起细胞凋亡。氧化应激能使肠细胞生长抑制或死亡，Gln 能抑制小肠黏膜细胞死亡[5]。Evans 等[6]的研究表明，Gln 能剂量依赖地抑制大鼠结肠上皮细胞凋亡，并且 Gln 抑制细胞凋亡的作用是特异性的，而谷氨酸（Glu）、半胱氨酸（Cys）和甘氨酸（Cly）均无此功能。过氧化氢（H_2O_2）能够氧化哺乳动物细胞，使其产生具损伤细胞的氧自由基[7]。自由基会攻击 DNA 双螺旋结构，导致其

chinaXiv:201711.01837v1

结构发生变化，从而影响细胞正常功能，最终可能导致细胞凋亡[8]。有研究显示，0.5、2.0 和 5.0 mmol/L Gln 可显著降低 H_2O_2 引发的猪小肠上皮细胞(intestinal porcine epithelial cells,IPEC-1)凋亡，其死亡细胞数量分别下降了 14.2%、54.4%和 95.4%[9]。因此，本试验旨在通过研究 Gln 对 H_2O_2 诱导的氧化应激状态下人结肠癌 HT-29 细胞抗氧化功能、细胞凋亡调控相关基因表达以及细胞凋亡状况，验证 Gln 是否具有抗氧化功能，并阐明其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

HT-29 细胞株由中国科学院上海生命科学研究院提供；RPMI1640 培养基、DMEM 培养基（含 4 500 mg/L *D*-葡萄糖和 110 mg/L 丙酮酸钠，不含 *L*-Gln）、0.25%胰酶细胞消化液、Gln 和胎牛血清购自 GIBCO 公司（Gaithersburg，美国）；Trizol 试剂、琼脂糖、逆转录酶、荧光定量（RT）-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司（Takara，日本）；丙二醛（malondiadehyde，MDA）含量、氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性测定试剂盒购自南京建成生物技术研究所；细胞培养六孔板（Corning，美国）、膜联蛋白 V-FITC/PI 双重荧光染料凋亡检测试剂盒购自联科生物有限公司。

1.2 细胞培养

HT-29 细胞用含 10%热灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中常规贴壁培养。待细胞长满至培养瓶底面积 80%之后传代，全部试验均用指数生长期细胞。

1.3 Gln 和 H_2O_2 处理 HT-29 细胞

将 HT-29 细胞传代培养在六孔板上，待 HT-29 细胞的覆盖率达到 80%，吸干原培养基，加入无 Gln 的 DMEM 培养基后培养 24 h，分别加入 Gln 和 H_2O_2 处理细胞，使得 Gln 的终浓度分别为 0（对照组）、0.5、2.0、10.0 mmol/L；H_2O_2 终浓度为 0.35 mmol/L。分别处理 12、24、32 h 后收集细胞用于后续的试验分析。

chinaXiv:201711.01837v1

chinaXiv:201711.01837v1

1.4　MDA 含量和 SOD 活性测定

1.4.1　裂解细胞

HT-29 细胞经过 Gln 和 H_2O_2 分别处理 12、24、32 h 后，弃培养基，用 4 ℃预冷生理盐水漂洗 3 遍后，加入 0.3 mL 预冷生理盐水，用细胞刮将细胞刮下并转移入 2.0 mL EP 管，加入 0.2 mL 生理盐水漂洗。将 EP 管置于冰水混合液中于超声粉碎仪上以 10 s/次间隔 10 s 的频率反复破碎 3 次。4 ℃ 5 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液备测。

1.4.2　MDA 含量测定

MDA 含量的测定原理为：过氧化脂质降解产物中的 MDA 可与硫代巴比妥酸缩合，形成红色产物，在 532 nm 处有最大峰值。具体操作参照试剂盒说明书。

1.4.3　SOD 活性测定

SOD 活性的测定原理为：通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基，后者与氧化羟胺作用形成亚硝酸盐，在显色剂的作用下呈现紫红色，用分光光度计测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时，则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用，使形成的亚硝酸盐含量减少，比色测定管的吸光度低于对照管，通过计算可求出被测样品中的 SOD 活性。具体操作参照试剂盒说明书。

1.5　总 RNA 提取和 cDNA 的制备

采用 Trizol 法[10]提取总 RNA，使用 SuperScript™ Ⅱ RTase 反转录试剂盒进行反转录。

1.6　荧光定量 PCR

1.6.1　引物设计和合成

采用 Primer Premier 6.0 和 Beacon designer 软件设计荧光引物，由上海生物工程有限公司负责合成，目标基因[脂肪酸合成酶（*FAS*）、*Caspase*-3、核转录因子 κB（*NF-κB*）、B 淋巴细胞瘤-2（*Bcl*-2）和 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白（*Bax*）]和 18S rRNA 的引物参数见表 1。

表 1　目标基因和 18S rRNA 的引物参数

Table 1　Parameters of primer pairs for target genes and 18S rRNA

基因	Genbank 序列号	引物序列	长度	退火温度

Gene	Genbank accession	Primer sequence (5'→3')	Size/bp	Annealing temperature/℃
脂肪酸合成酶 *FAS*	BC012479	F: GTTGGTGGACCCGCTCAGTA R: AATCTAGCAACAGACGTAAGAACCAG	118	62
天冬氨酸蛋白水解酶 3 *Caspase* 3	NM_032991	F: GACAGACAGTGGTGTTGATGATGAC R: GCATGGCACAAAGCGACTGGAT	148	62
核转录因子 κB *NF-κB*	L19067.1	F: TCTGCCGAGTGAACCGAAACTCTG R: CCTGGTCCCGTGAAATACACCTCA	110	62
B 淋巴细胞瘤-2 *Bcl*-2	NM_000633	F: GCTGGGATGCCTTTGTGGAACT R: CAGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC	71	62
B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 *Bax*	NM_004324	F: CCCTTTTGCTTCAGGGTTTCATCCA R: CTTGAGACACTCGCTCAGCTTCTTG	122	62
18S	NR_003286	F: GACTCAACACGGGAAACCTCAC R: CCAGACAAATCGCTCCACCAAC	122	62

chinaXiv:201711.01837v1

1.6.2 荧光定量 PCR 扩增体系和反应条件

将反转的 cDNA 按照 SYBR® Premix Ex Taq™(Perfect Real Time)试剂盒操作，采用 25 μL 反应体系，在 CFX384 多重实时荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-Rad）中进行荧光定量 PCR。最佳反应条件为：95 ℃预变性 1 min；95 ℃变性 10 s，62 ℃ 25 s；退火/延伸进行 45 个循环；溶解曲线为单峰。每个待测样品设置 3 个重复，对得到的 3 个 Ct 值取算术平均值，以备带入公式进行计算 mRNA 相对表达量。

1.7 流式细胞仪分析

使用 Annexin V-FITC（Annexin V-fluorescein isothiocyanate）和 PI（propidium iodide）对 HT-29 细胞进行双染，然后使用流式细胞仪，分别通过 FITC 和 PI 的放射波长 530 和 585 nm 进行检测分析。采用双变量流式细胞仪的散点图进行检测分析，左下象限代表活细胞（FITC-/PI-）；左上象限为坏死细胞（FITC-/PI+）；右下象限为早期凋亡细胞（FITC+/PI-）；右上象限代表晚期凋亡细胞（FITC+/PI+）。所

以细胞的总凋亡率是右上象限（FITC+/PI+）和右下象限（FITC+/PI-）之和[11]。

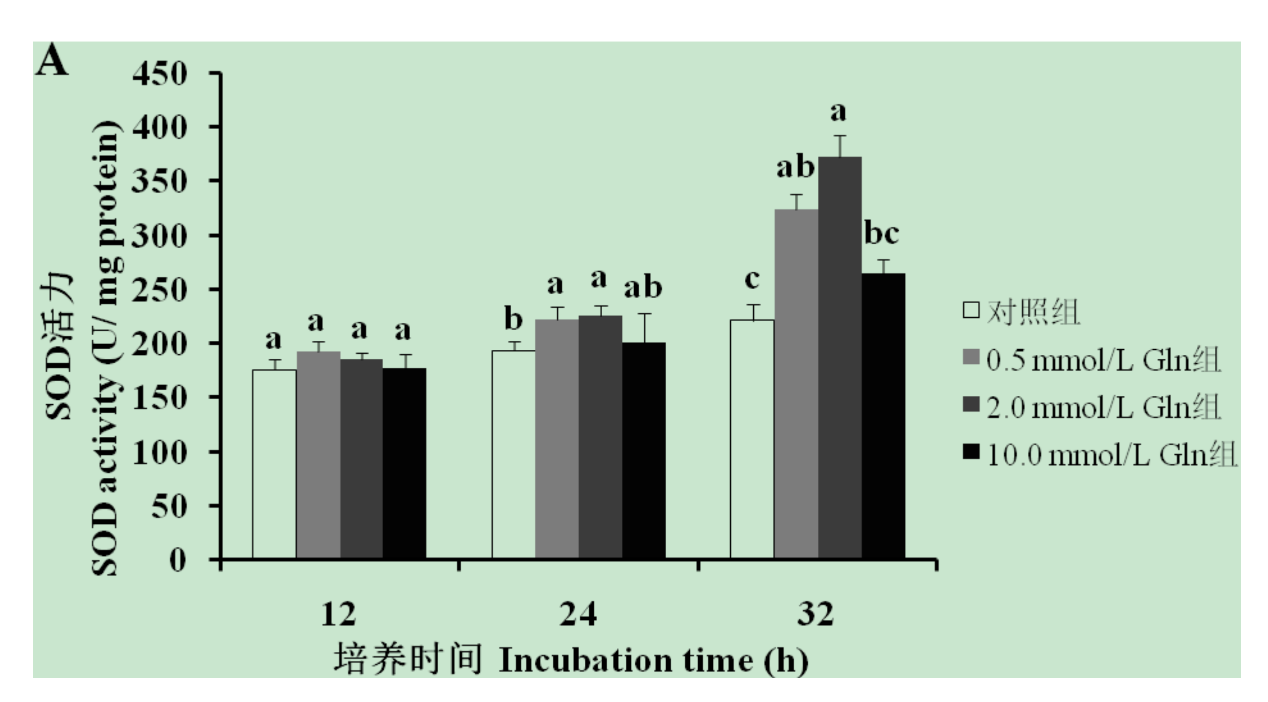
1.8　数据处理

所有数据均采用SPSS v16.0软件进行方差分析，结果以平均值±标准误表示，P<0.05为差异显著性水平。

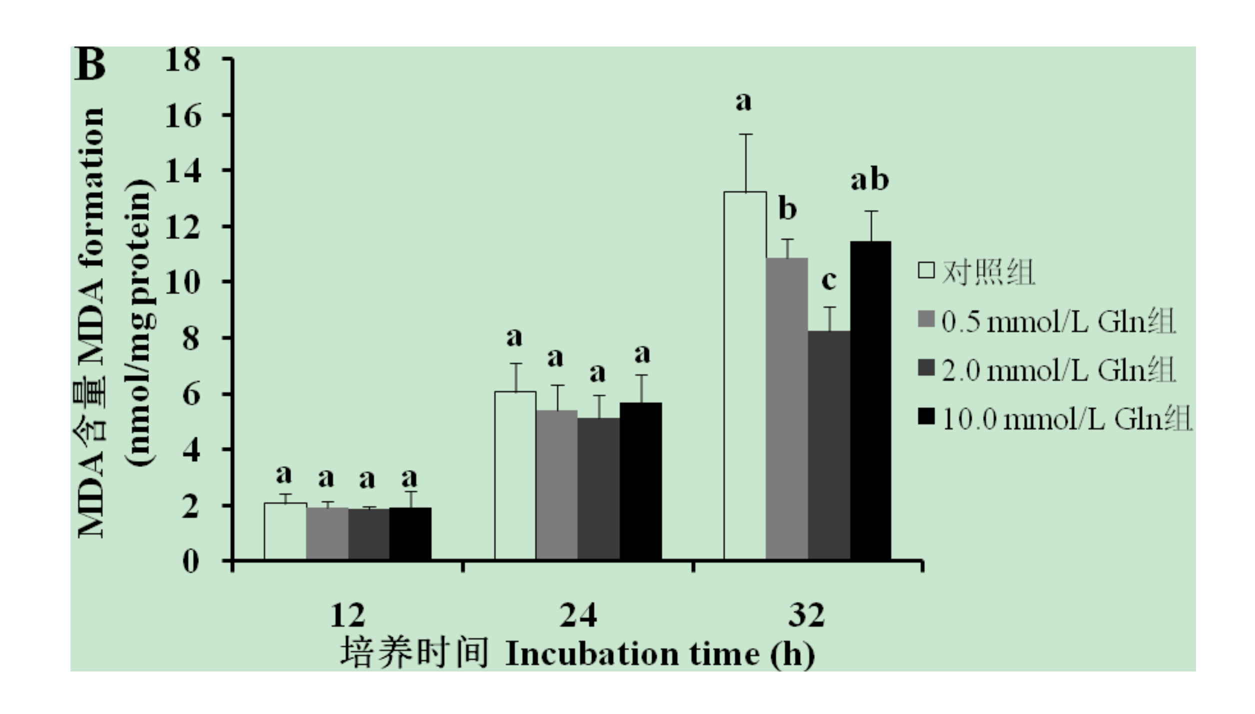
2　结　果

2.1　Gln 对 H_2O_2 诱导的氧化状态改变的影响

由图 1 可知，处理 12 h 后，各组间 SOD 活性和 MDA 含量无显著差异（P>0.05）。处理 24 h 后，对照组 SOD 活性显著低于 0.5、2.0 mmol/L Gln 组（P<0.05），各组间 MDA 含量无显著差异（P>0.05）。处理 32 h 后，0.5、2.0 和 10.0 mmol/L Gln 组 SOD 活性与对照组比较，分别升高了 46.40%（P<0.05）、67.99%（P<0.05）和 19.71%（P>0.05）；与之对应的是 MDA 含量分别减少了 17.79%（P<0.05）、37.66%（P<0.05）和 13.09%（P>0.05）。



chinaXiv:201711.01837v1



数据柱标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），相同或无字母表示差异不显著（$P>0.05$）。图 2 同。

Value columns with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$). The same as Fig.2.

图 1　Gln 对 H_2O_2 处理的 HT-29 细胞 SOD 活性(A)和 MDA 含量（B）的影响

Fig. 1　Effects of Gln on SOD activity (A) and MDA content in H_2O_2-treated HT-29 cell (n=3).

2.2　Gln 对 H_2O_2 诱导的细胞凋亡相关基因表达的影响

由图 2 可知，用 0.35 mmol/L H_2O_2 处理 HT-29 细胞，在 12、24 和 32 h 3 个时间段，促进细胞凋亡相关基因 *FAS*、*Caspase*-3、*NF-κB*、*Bax* mRNA 相对表达量相一致，均为先降低后升高；而抑制细胞凋亡的基因 *Bcl*-2 mRNA 相对表达量则相反，为先升高后降低。

处理 12 h 后，各组的 *Caspase*-3 和 *Bax* mRNA 相对表达量无显著差异（$P>0.05$）。与对照组比较，0.5 mmol/L Gln 组 *NF-κB* mRNA 相对表达量显著降低（$P<0.05$），0.5 与 2.0 mmol/L Gln 组 *Bcl*-2 mRNA 相对表达量显著增加（$P<0.05$）。

处理 24 h 后，与对照组比较，0.5、2.0 和 10.0 mmol/L Gln 组 *Caspase*-3、*NF-κB* 和 *Bax* mRNA 相对表达量均能显著降低（$P<0.05$）。2 mmol/L Gln 组 *FAS* 和 *Caspase*-3 mRNA 相对表达量分别比对照组降

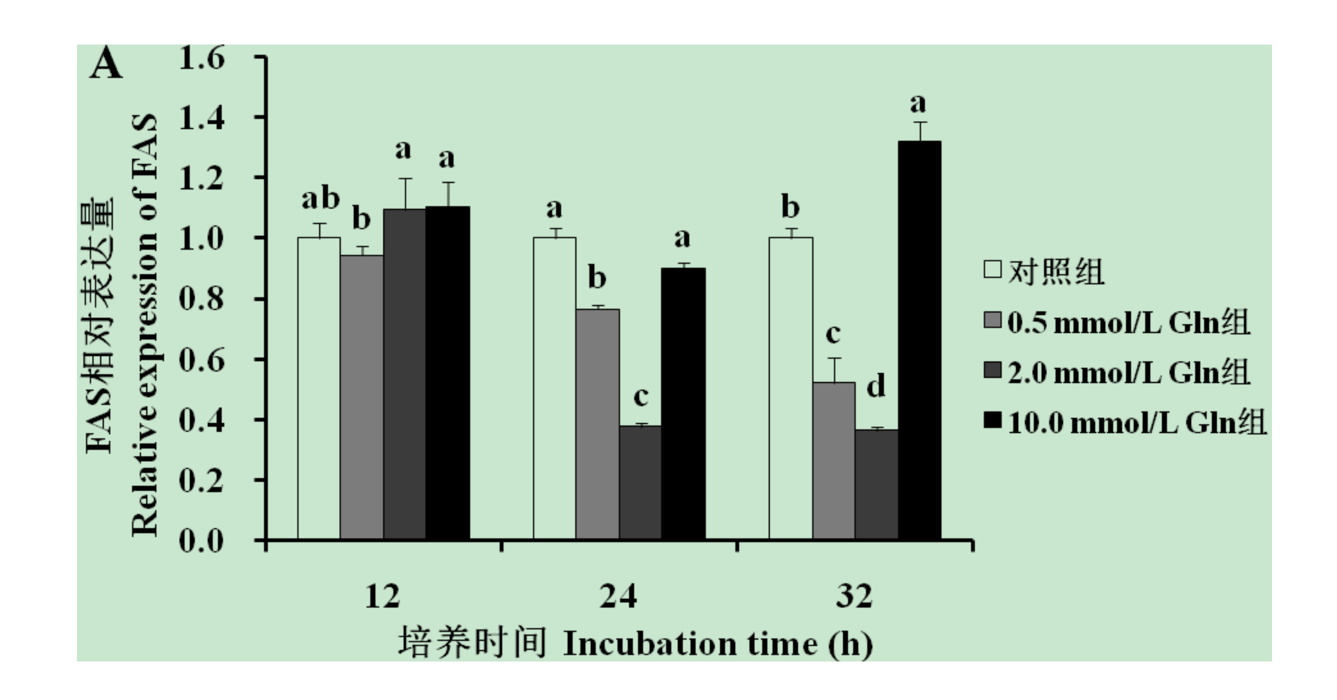
chinaXiv:201711.01837v1

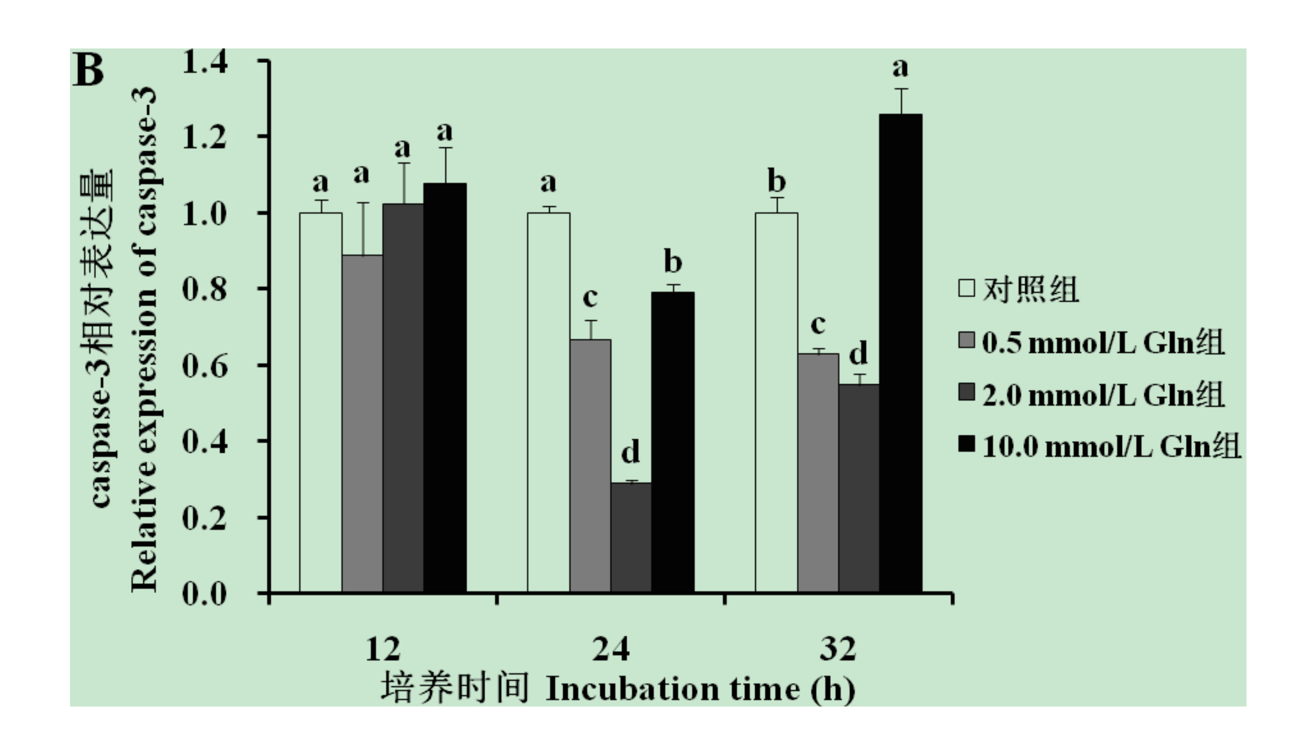
ChinaXiv合作期刊

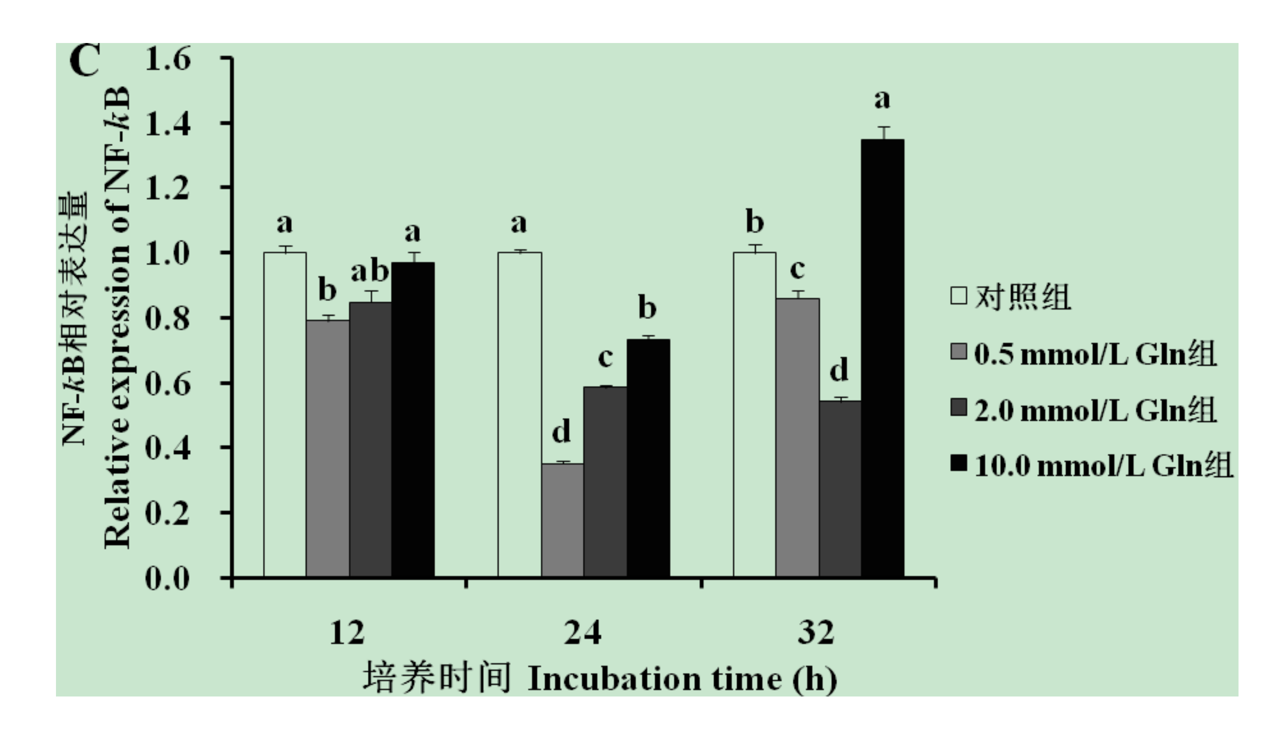
低了 62.27%和 71.13%（*P*<0.05），0.5 mmol/L Gln 组 *NF-κB* 和 *Bax* mRNA 相对表达量分别比对照组降低了 64.85%和 65.05%（*P*<0.05），10.0 mmol/L Gln 组 *FAS* mRNA 相对表达量与对照组无显著差异（*P*>0.05）。0.5、2.0 和 10.0 mmol/L Gln 组 *Bcl*-2 mRNA 相对表达量在较对照组分别升高了 1 404.65%、1 559.21%和 623.76%（*P*<0.05）。

处理 32 h 后，与对照组比较，2.0 mmol/L Gln 组 *FAS*、*Caspase*-3、*NF-κB*、*Bax* mRNA 相对表达量分别降低了 63.55%、45.11%、41.49%和 30.22%（*P*<0.05），*Bcl*-2 mRNA 相对表达量升高了 44.30%（*P*<0.05）。与对照组比较，10.0 mmol/L Gln 组 *FAS*、*Caspase*-3、*NF-κB*、*Bax* mRNA 相对表达量分别增加了 31.78%、25.83%、34.77%和 20.35%（*P*<0.05），*Bcl*-2 mRNA 相对表达量与对照组无显著差异（*P*>0.05）。

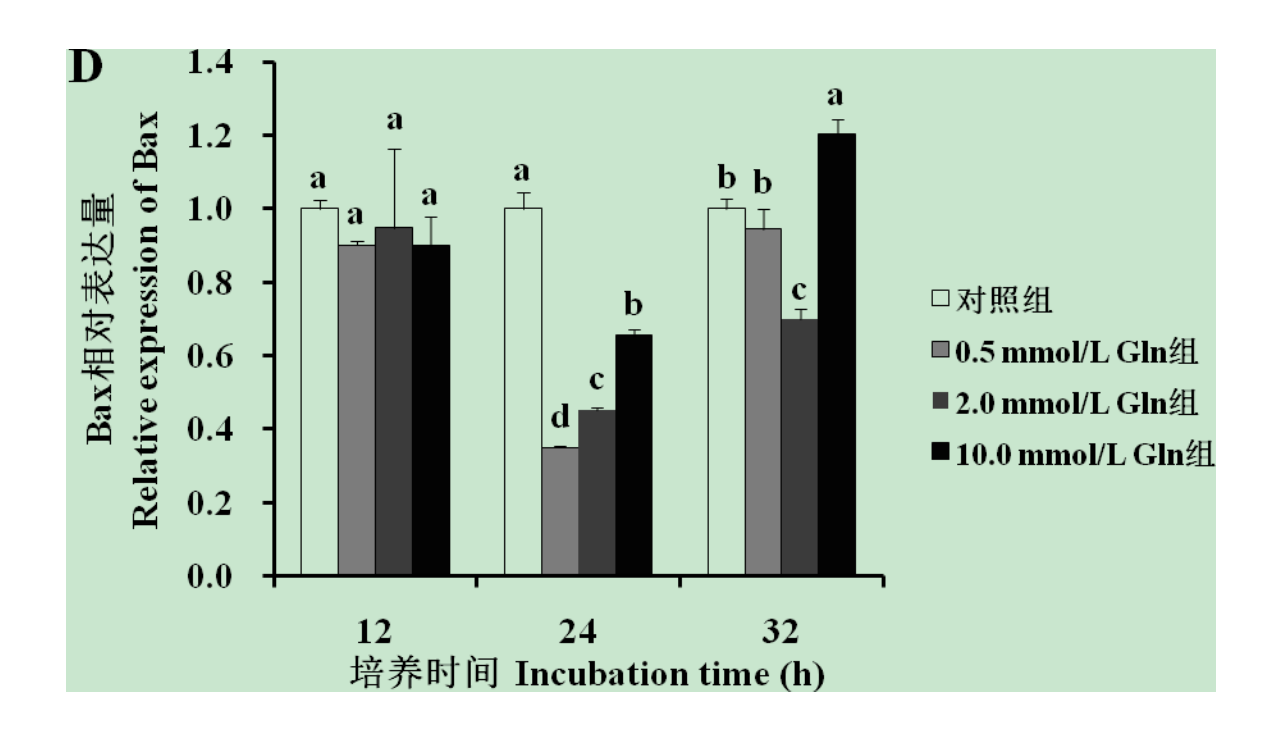
chinaXiv:201711.01837v1

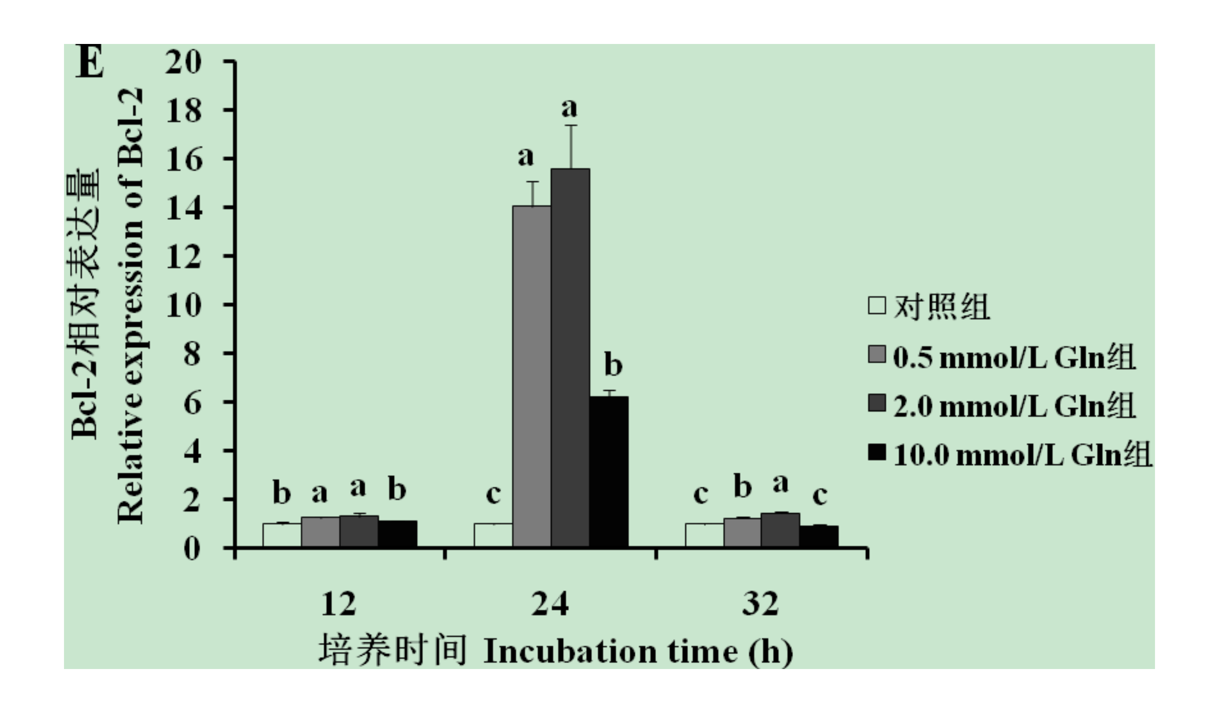






chinaXiv:201711.01837v1





chinaXiv:201711.01837v1

图 2 Gln 对 H_2O_2 处理的 HT-29 细胞 *FAS*(A)、*Caspase*-3(B)、*NF-κB*(C)、*Bax*(D)和 *Bcl*-2(E) mRNA 相对表达量的影响

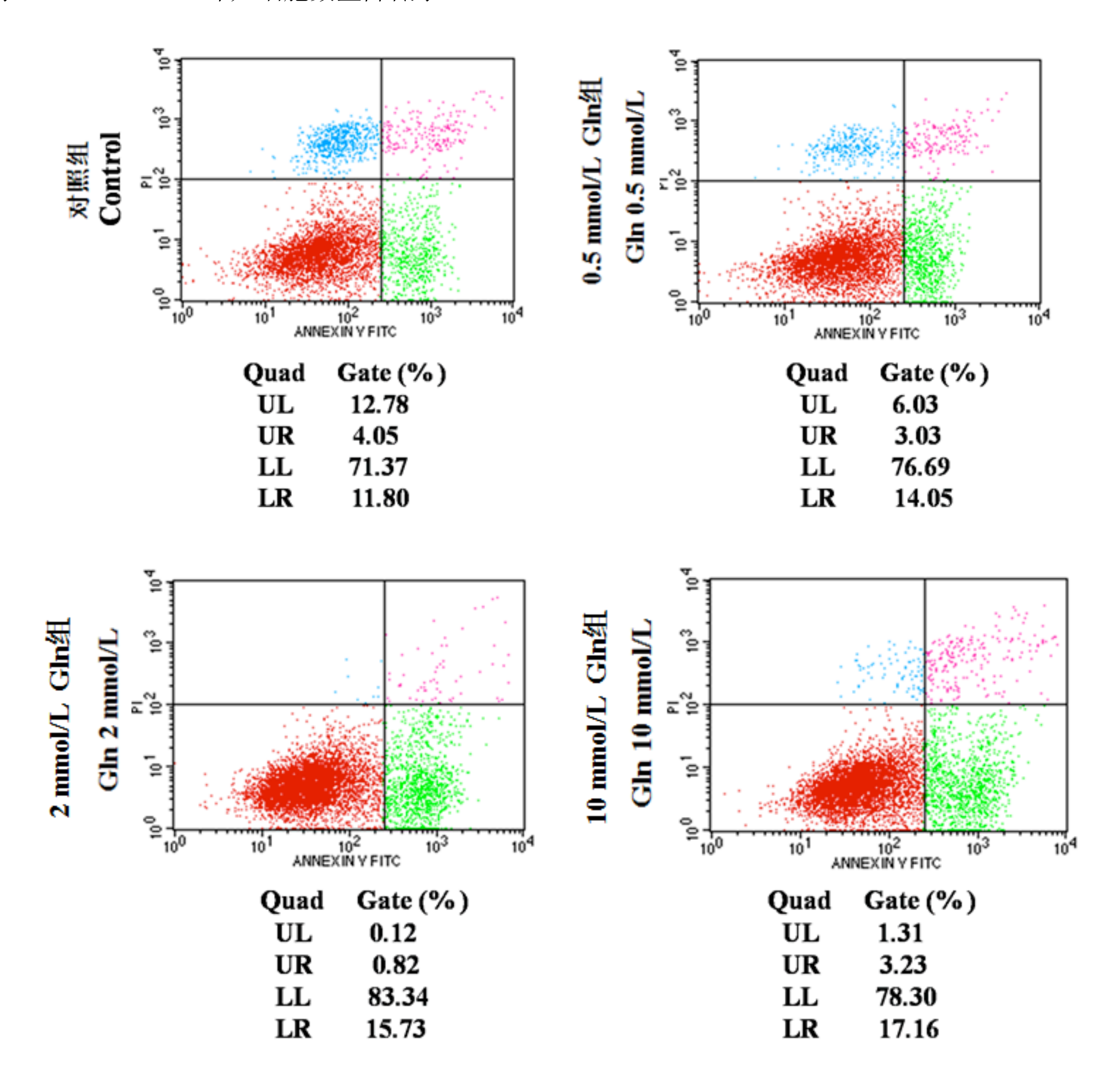
Fig. 2 Effects of Gln on relative expression of *FAS* (A), *Caspase*-3 (B), *NF-κB* (C), *Bax* (D) and *Bcl*-2 (E) mRNA in H_2O_2-treated HT-29 cell （*n*=3）

chinaXiv:201711.01837v1

2.3　流式细胞仪分析细胞的凋亡情况

采用 Annexin V-FITC/PI 双染法对细胞染色，并用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。由图 3 可知，处理 24 h 后，对照组和 0.5、2.0、10.0 mmol/L Gln 组活细胞数量分别为 71.37%、76.69%、83.34%和 78.30%，坏死细胞数量分别为 12.78%、6.03%、0.12%和 1.31%。Gln 处理使活细胞数量提高了 5.32%~11.97%，坏死细胞数量降低了 6.75%~12.66%。

由图 4 可知，处理 32 h 后，对照组和 0.5、2.0、10.0 mmol/L Gln 组活细胞数量分别为 61.73%、66.70%、70.36%和 63.12%，坏死细胞数量分别为 21.61%、17.57%、17.04%和 18.21%。Gln 处理使活细胞数量提高了 1.39%~7.63%，坏死细胞数量降低了 3.40%~4.57%。



UL：坏死细胞；UR：晚期凋亡细胞；LL：活细胞；LR：早期凋亡细胞。下图同。

chinaXiv:201711.01837v1

UL: necrotic cells; UR: late apoptotic cells; LL: living cells; LR: early apoptotic cells. The same as below.

图 3　Annexin V-FITC/PI 双染法检测 24 h Gln 对 H_2O_2 处理的 HT-29 细胞凋亡的影响

Fig. 3　Effects of Gln on apoptosis with Annexin V-FITC/PI staining method in H_2O_2-treated HT-29 cell at 24 h

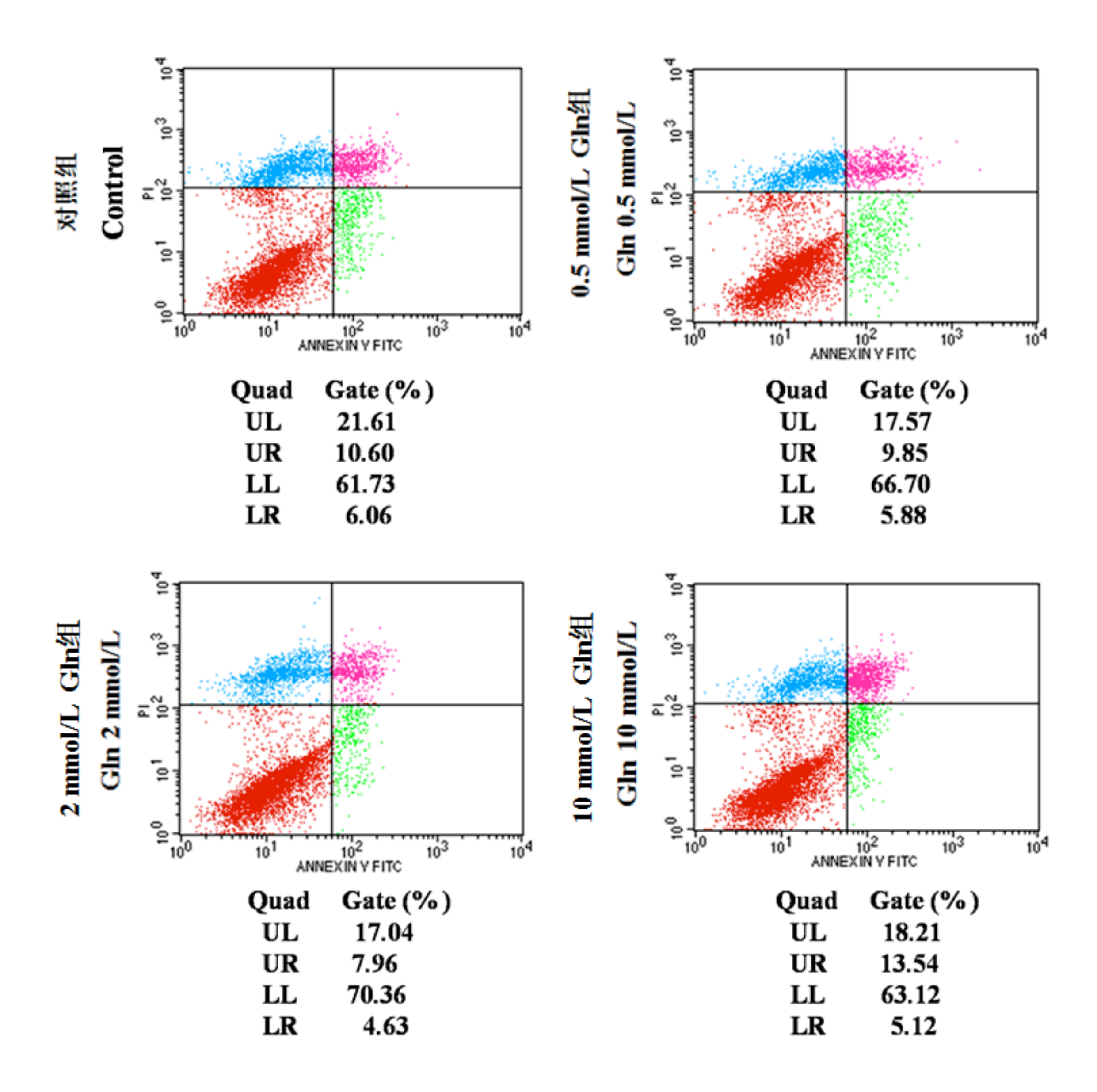


图 4　Annexin V-FITC/PI 双染法检测 32 h Gln 对 H_2O_2 处理的 HT-29 细胞凋亡的影响

Fig.4　Effects of Gln on apoptosis with Annexin V-FITC/PI double staining method in H_2O_2-treated HT-29 cell at 32 h

ChinaXiv合作期刊

3 讨　论

MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一，可通过 MDA 含量了解膜脂过氧化的程度，以间接反映膜系统受损程度；而 SOD 在清除自由基、抗氧化损伤和维持细胞的结构方面都起着很重要的作用。在本研究中，我们采用 H_2O_2 刺激 HT-29 细胞，建立氧化损伤模型，发现 Gln 可以提高 HT-29 细胞 SOD 活性；H_2O_2 诱导的对照组脂质过氧产物 MDA 含量较高，0.5 和 2.0 mmol/L Gln 处理细胞可以显著地降低 MDA 含量，表明 Gln 可提高抗氧化作用而改善氧化应激造成的细胞膜通透性的增加，从而对细胞损伤有一定的保护作用[12]。

细胞凋亡相关基因 *FAS*、*Caspase*-3、*NF-κB*、*Bax* 和抑制细胞凋亡基因 *Bcl*-2 互为拮抗，在氧化应激引起的细胞凋亡中发挥着重要作用[6-7]。本试验结果表明，0.5 和 2.0 mmol/L Gln 可以降低 H_2O_2 诱导氧化应激 HT-29 细胞 *FAS*、*Caspase*-3、*NF-κB* 和 *Bax* mRNA 相对表达量，而提高 *Bcl*-2 mRNA 相对表达量。Haynes 等[13]指出，由于 Gln 的化学特性不能直接改变 H_2O_2 的存在形式，且肠道细胞的凋亡并不是接触 H_2O_2 开始，而是需要一个较长的时间（例如 12 h）来影响基因表达和信号传导。因为 H_2O_2 扩散进入细胞是有限的，其经由水通道蛋白同系物穿过细胞膜进入细胞[14]。已有研究报道 H_2O_2 是通过激活氧化应激调节因子 Caspase-3 和 NF-κB 诱导细胞凋亡[15]。Caspase-3 是其家族中最重要的一员，处于细胞凋亡的共同路径上，是细胞凋亡的关键执行者之一。正常情况下，Caspase-3 在胞质中以无活性的酶原形式存在，只有当细胞外凋亡信号使之激活为有活性的 Caspase-3 时，才引起细胞质、细胞核及细胞构架的关键蛋白酶失活，导致细胞凋亡。在细胞内，H_2O_2 激活 *FAS* 基因和提高细胞色素 C 从线粒体中的释放，这导致通过 Caspase-8 和 Caspase-9 途径激活 Caspase-3，而 Caspase-3 导致细胞 DNA 片段化[16]。此外，H_2O_2 激活 NF-κB，增加“死亡”相关基因表达，抑制了“存活”相关基因表达[17]。Bcl-2 及其同系物可阻止线粒体膜损伤和细胞色素 C 等促凋亡因子的释放，但 Bax 作用正好相反，促进线粒体膜损伤和细胞色素 C 的释放，Bcl-2/Bax 比例通常是反映细胞程序性死亡的标准[18]。我们的研究结果得出，Gln 增加氧化应激状态下 HT-29 细胞 Bcl-2/Bax 比例，说明 Gln 可以通过线粒体途径抑制氧化应激诱导细胞凋亡。目前，Gln 促进 *Bcl*-2 mRNA 相对表达量的相关机制可能与 Gln 增加线粒体膜的稳定性有关，也可能通

chinaXiv:201711.01837v1

过诱导热休克蛋白 70 (*HSP*70)的表达，进而增强 *Bcl*-2 的表达[19]。

本试验发现，当 H_2O_2 和 Gln 与 HT-29 细胞共培养 32 h 后，高浓度（10 mmol/L）Gln 促进 H_2O_2 诱导应激的细胞凋亡相关基因的表达，*FAS*、*Caspase*-3、*NF-κB*、*Bax* mRNA 相对表达量分别比对照组增加了 31.78%、25.83%、34.77%和 20.35%，且流式细胞仪分析也得到相一致的结果，即凋亡细胞数量与对照组接近，多于 0.5 和 2.0 mmol/L Gln 组。说明 Gln 抑制细胞凋亡存在一定的浓度依赖性。在一定的浓度范围内，Gln 可有效地抑制由氧化应激引起的细胞凋亡，而超过一定浓度范围，细胞凋亡率与 Gln 浓度变化无直接线性关系，这与前人的研究结果[20-21]相一致。产生这种现象的原因可能是 Gln 通过谷氨酰胺酶反应生成谷氨酸和氨（NH_3）[13]，而在细胞培养时间较长，Gln 浓度高的情况下，培养基中 NH_3 浓度较高，高浓度 NH_3 对细胞具有损伤作用。

4 结　论

Gln 可以有效提高 H_2O_2 诱导的氧化应激 HT-29 细胞 SOD 活性，降低 MDA 含量，降低氧化应激状态 HT-29 细胞促进细胞凋亡基因 *FAS*、*Caspase*-3、*NF-κB* 和 *Bax* 表达，而提高抑制细胞凋亡基因 *Bcl*-2 表达，减少细胞氧化损伤和凋亡。

参考文献：

[1] RHOADS J M,WU G Y.Glutamine,arginine,and leucine signaling in the intestine[J].Amino Acids,2009,37(1):111–122.

[2] HUBERT-BURON A,LEBLOND J,JACQUOT A,et al.Glutamine pretreatment reduces IL-8 production in human intestinal epithelial cells by limiting IκBα ubiquitination[J].Journal of Nutrition,2006,136(6):1461–1465.

[3] 闫静,叶琳.谷氨酰胺在肝损伤中的应用研究进展[J].肠外与肠内营养,2016,23(1):55–58.

[4] 郑善军,蒋宝泉,唐蓉,等.谷氨酰胺对放射损伤大鼠肠粘膜屏障功能和抗氧化能力的影响[J].第三军医大学学报,2003,25(11):968–970.

chinaXiv:201711.01837v1

ChinaXiv合作期刊

[5] CHAUDHRY K K,SHUKLA P K,MIR H,et al.Glutamine supplementation attenuates ethanol-induced disruption of apical junctional complexes in colonic epithelium and ameliorates gut barrier dysfunction and fatty liver in mice[J].The Journal of Nutritional Biochemistry,2016,27:16–26

[6] EVANS M E,JONES D P,ZIEGLER T R.Glutamine prevents cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells[J].Journal of Nutrition,2003,133(10):3065–3071.

[7] RIDER J E,HACKER A,MACKINTOSH C A,et al.Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide[J].Amino Acids,2007,33(2):231–240.

[8] HE Y F,LI B Z,LI Z,et al.Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA[J].Science,2011,333(6047):1303–1307.

[9] GHIRINGHELLI F,APETOH L,TESNIERE A,*et al.*Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1β–dependent adaptive immunity against tumors[J].Nature Medicine,2009,15(10):1170–1178.

[10] 赵继荣,毕阳,刘红霞,等.Trizol 法提取厚皮甜瓜果实 RNA 条件的筛选[J].甘肃农业大学学报,2009,44(2):56–59.

[11] JIA Y D,LIN J X,MI Y L,et al.Quercetin attenuates cadmium-induced oxidative damage and apoptosis in granulosa cells from chicken ovarian follicles[J].Reproductive Toxicology,2011,31(4):477–485.

[12] XIAO L,CAO W,LIU G M,et al.Arginine,N-carbamylglutamate,and glutamine exert protective effects against oxidative stress in rat intestine[J].Animal Nutrition,2016,2(3):242–248.

[13] HAYNES T E,LI P,LI X L,et al.L-Glutamine or *L*-alanyl-*L*-glutamine prevents oxidant-or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes[J].Amino Acids,2009,37(1):131–142.

[14] BIEBER F R,BRENNER C H,LAZER D.Finding criminals through DNA of their relatives[J].Science,2006,312(5778):1315–1316.

[15] WANG S S,PURDUE M P,CERHAN J R,et al.Common gene variants in the tumor necrosis factor (TNF)

chinaXiv:201711.01837v1

ChinaXiv合作期刊

and TNF receptor superfamilies and NF-κB transcription factors and non-Hodgkin lymphoma risk[J].PLoS One,2009,4(4):e5360.

[16] JONES P A,LIANG G N.Rethinking how DNA methylation patterns are maintained[J].Nature Reviews Genetics,2009,10(11):805–811.

[17] CHANDRA J,SAMALI A,ORRENIUS S.Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress[J].Free Radical Biology and Medicine,2000,29(3/4):323–333.

[18] REED J C.Bcl-2 family proteins[J].Oncogene,1998,17(25):3225–3236.

[19] 生伟,池一凡,孙忠东.热休克蛋白 70 对供心细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J].中国心血管病研究杂志,2007,5(1):49–51.

[20] 韩建立.丙氨酰-谷氨酰胺对人结肠癌细胞株增殖活性的影响[J].中华胃肠外科志,2003,6(5):339–341.

[21] DILSHARA M G,JEONG J W,JAYASOORIYA R G P T,et al.Glutamine deprivation sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to TRIAL-mediated apoptosis[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2017,485(2):440–445.

chinaXiv:201711.01837v1

Effects of Glutamine on Oxidative Damage and Apoptosis of Human Enterocyte-Like HT-29 Cells Induced by Hydrogen Peroxide

XIAO Yingping[1,2] GUI Guohong[3] CHEN Anguo[4] HE Xiangxiang[1,2] LI Kaifeng[1,2] YANG Hua[1,2*]

(1. *Institute of Quality and Standard for Agro-Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou* 310021, *China;* 2. *State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou* 310021, *China;* 3. *College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang* 550025, *China;* 4. *College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou* 310058, *China)*

Abstract: This experiment was conducted to study effects of glutamine (Gln) on oxidative damage and apoptosis of human enterocyte-like HT-29 cells induced by hydrogen peroxide (H_2O_2), and to explore the antioxidant function of Gln and its mechanisms. HT-29 cells I were induced by 0 （control group）, 0.5, 2.0 and

ChinaXiv合作期刊

10.0 mmol/L Gln and 0.35 mmol/L H_2O_2 for 12, 24 and 32 h, the superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in cells were measured, and the mRNA relative expression of related to cell apoptosis gene were also assessed by RT-PCR. Furthermore, the HT-29 cells were dyed with the Annexin V-FITC/PI double staining method, and the apoptosis of cells was determined by the flow cytometer. The results showed as follows: 1) after treated 24 h, the SOD activity in 0.5 and 2.0 mmol/L Gln groups was significantly higher than that in control group ($P<0.05$); after treated 32 h, the SOD activity in 0.5 and 2.0 mmol/L Gln groups was significantly higher than that in control group ($P<0.05$), and the MDA content was significantly lower than that in control group ($P<0.05$). 2) After treated 12 h, there were no significant differences on the mRNA relative expressions of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (*Caspase*-3) and B cell lymphoma/leukemia-2 associated X protein (*Bax*) among all groups ($P>0.05$). Compared with the control group, the mRNA relative expression of nuclear factor kappa B (*NF-κB*) in 0.5 mmol/L Gln group was significantly decreased ($P<0.05$), the mRNA relative expression of B cell lymphoma/leukemia-2 （*Bcl*-2） in 0.5 and 2.0 mmol/L Gln groups was significantly increased ($P<0.05$). After treated 24 h, compared with the control group, the mRNA relative expressions of *Caspase*-3, *NF-κB* and *Bax* in 0.5, 2.0 and 10.0 mmol/L Gln groups were significantly decreased ($P<0.05$), while the mRNA relative expression of *Bcl*-2 was significantly increased ($P<0.05$). After treated 32 h, compared with the control group, the mRNA relative expressions of fatty acid synthase (*FAS*), *Caspase*-3, *NF-κB* and *Bax* in 2.0 mmol/L Gln group were significantly decreased ($P<0.05$), while the mRNA relative expression of *Bcl*-2 was significantly increased ($P<0.05$); the mRNA relative expressions of *FAS*, *Caspase*-3, *NF-κB* and *Bax* in 10.0 mmol/L Gln group were significantly decreased ($P<0.05$). 3) After treated 24 h, compared with the control group, the living cells number in Gln groups increased by 5.32% to 11.97%, and the necrotic cells number decreased by 6.75% to 12.66%. After treated 32 h, compared with the control group, the living cells number in Gln groups increased by 1.39% to 7.63%, and the necrotic cells number decreased by 3.40% to 4.57%. It is concluded that glutamine can restrain the oxidant damage of HT-29 induced by H_2O_2 and decrease the cells apoptosis.

Key words: glutamine; oxidative damage; cell apoptosis; HT-29 cell; hydrogen peroxide

chinaXiv:201711.01837v1

---

*Corresponding author, senior livestock engineer, E-mail: yanghua806@hotmail.com （责任编辑　武海龙）